

図 1 2 : 血漿中APL1 β 検出定量のための前処理法の検討

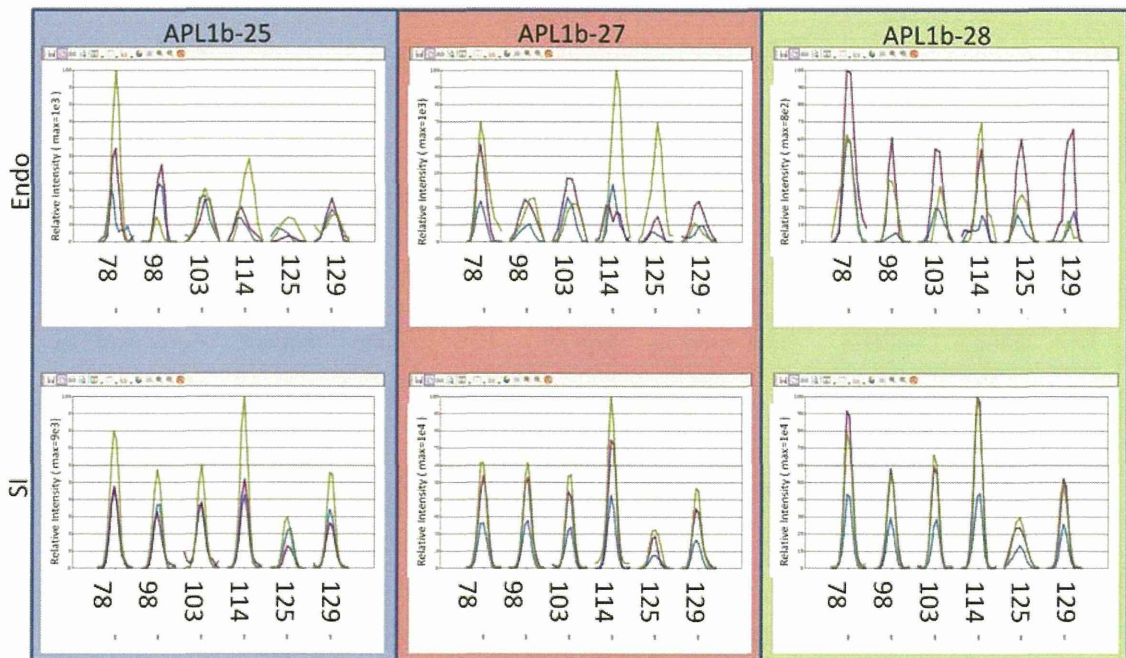


図 1 3 : SRM/MRMを用いた血漿中APL1 β の定量

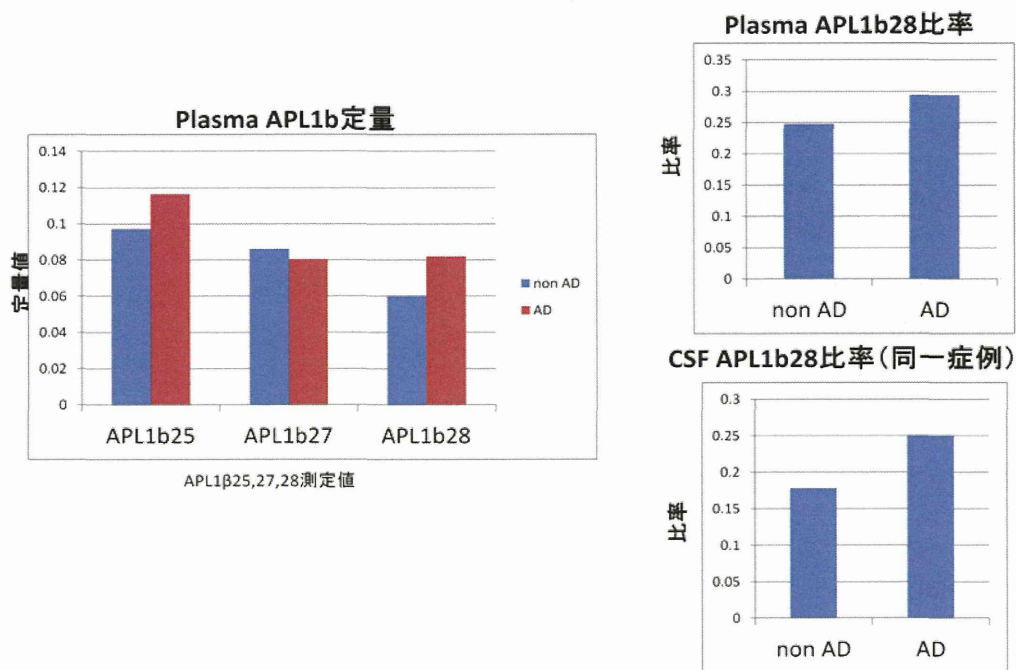
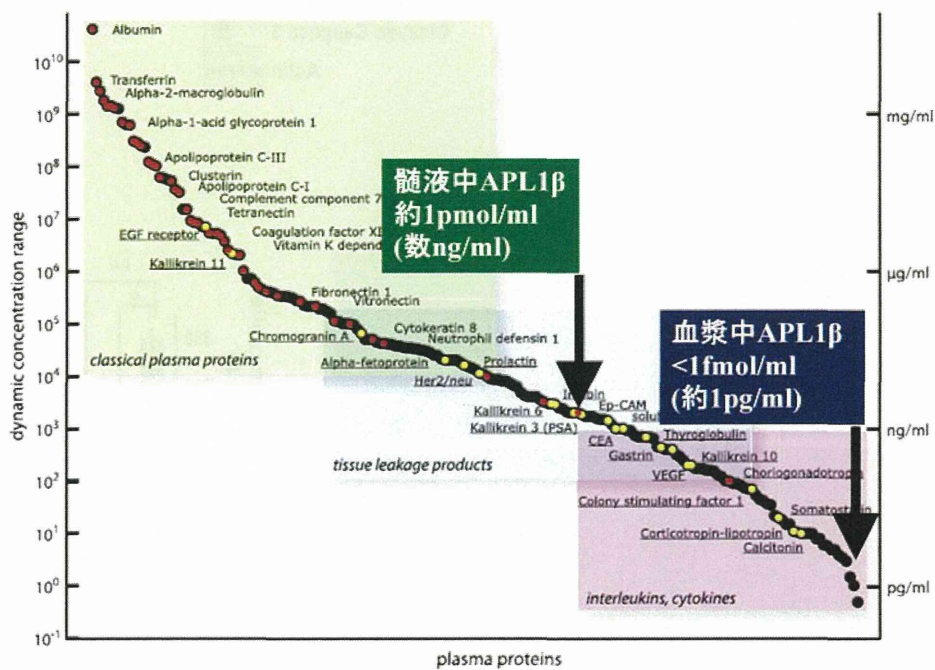


図 1 4 : APL1 β 28/total APL1b比率は血漿中と髄液中で相関する



Schiess et al., Molecular oncology 3, 33-44, 2009

図 1 5 : SRM/MRMを用いた血漿中 APL1 β の超高感度定量

マイクロアレイ解析

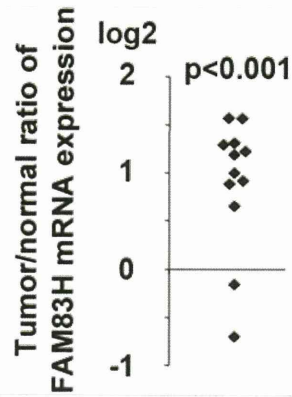
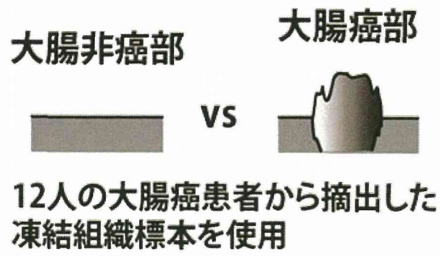


図 1 6 : FAM83Hは大腸癌で発現増大している

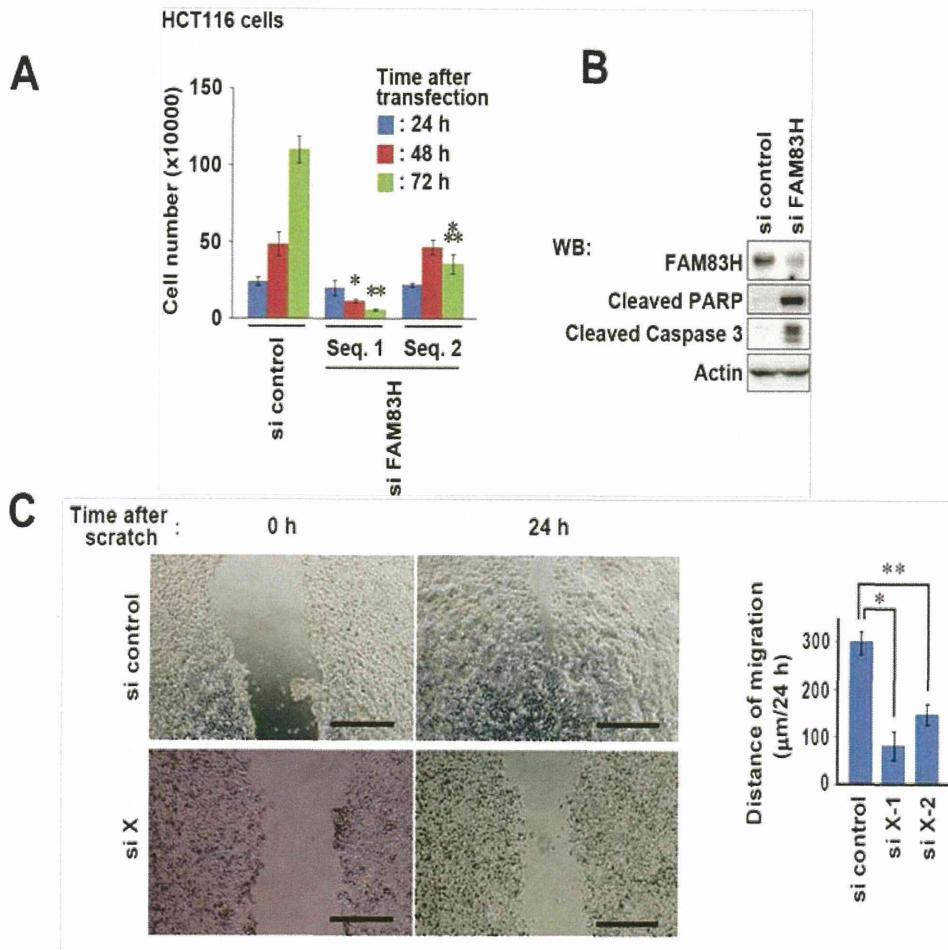


図 1 7 : FAM83Hは細胞増殖 (A)、遊走 (B) に関する

Specific interactions: 76

Identified Proteins (TOP10)	Accession	MW (kDa)	Spectral count/kDa	
			FAM83H	Control
Protein FAM83H	FA83H	130	49.0	0.0
Keratin, type I cytoskeletal 19	K1C19	44	15.3	0.5
Keratin, type I cytoskeletal 18	K1C18	48	11.5	0.1
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C	71	8.3	0.2
Protein unc-45 homolog A	UN45A	103	4.5	0.0
Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B	83	4.2	0.0
Heat shock 70 kDa protein 1	HSP71	70	4.0	0.0
Plectin	PLEC	532	4.0	0.0
60S ribosomal protein L38	RL38	8	3.9	0.0
Casein kinase I isoform alpha	KC1A	39	3.5	0.0

Dynamic exclusion: OFF

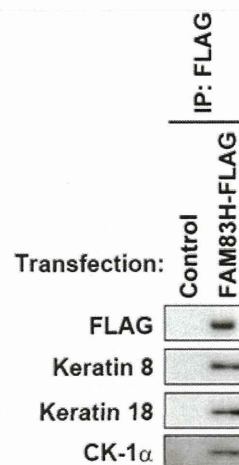


図 1 8 : FAM83Hと相互作用する因子の解析

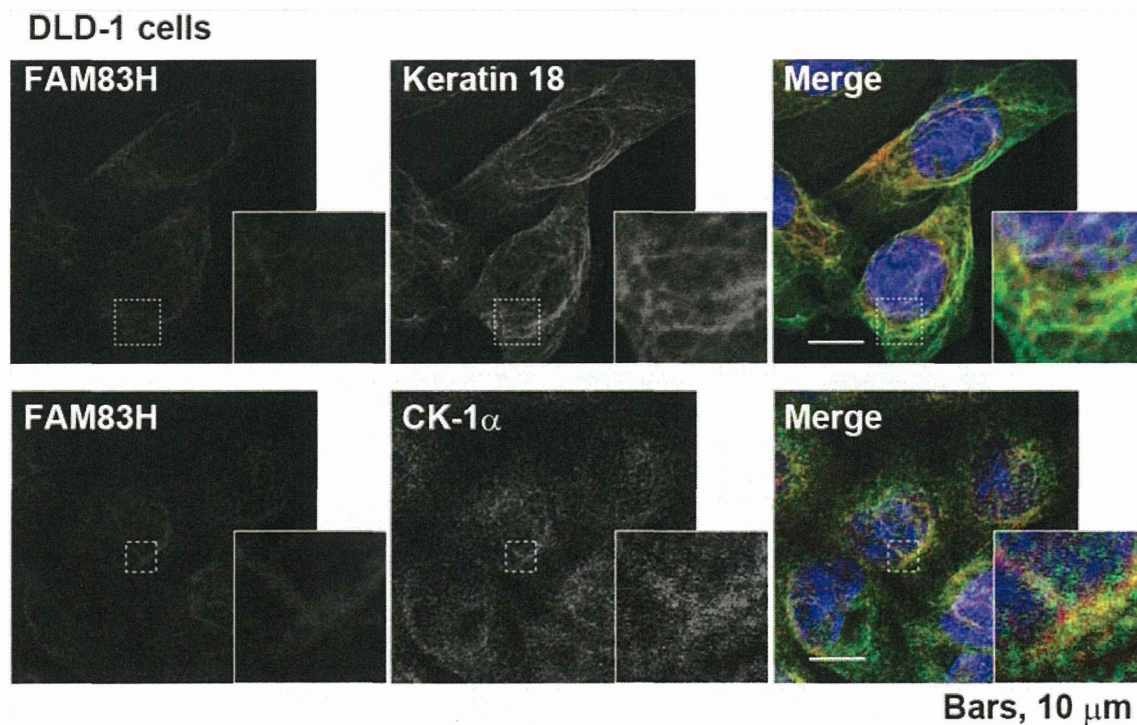


図 1 9 : FAM83HはCK-1α, keratinと複合体を形成している

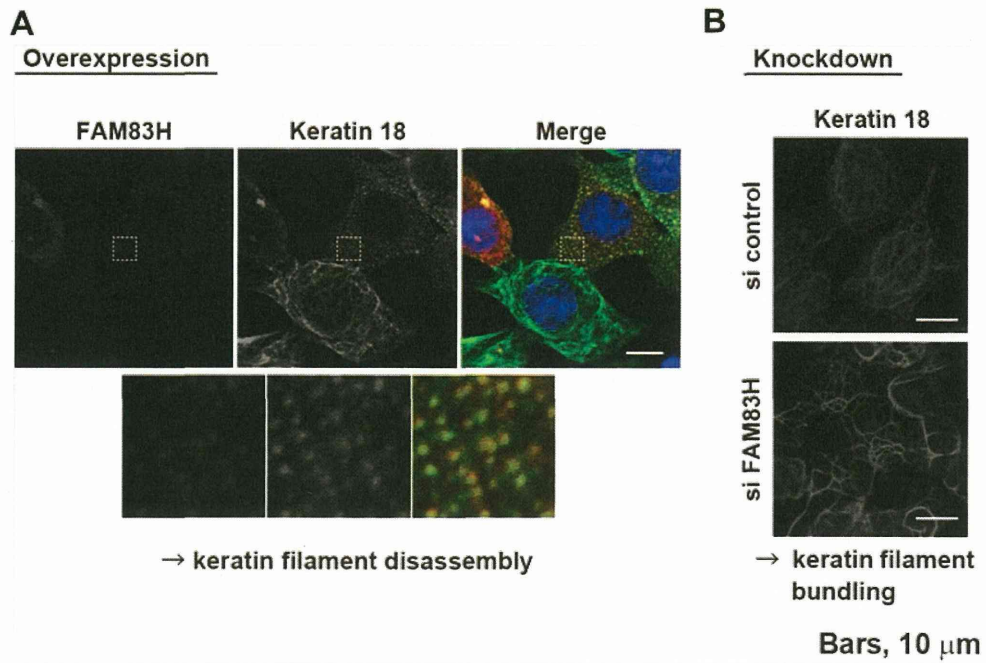


図 2 0 : FAM83Hはケラチン細胞骨格形成に関わっている

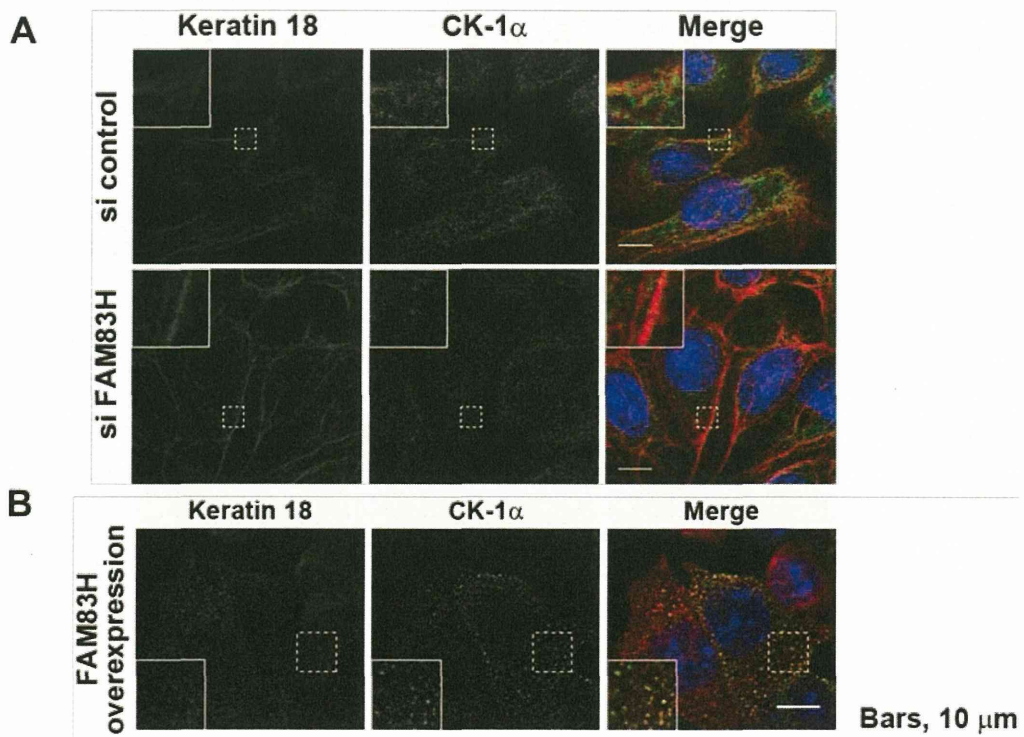
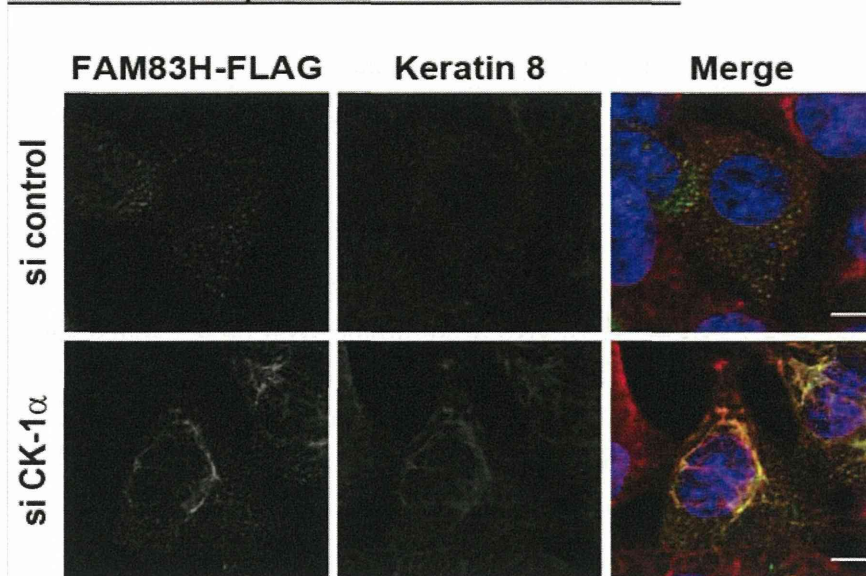


図 2 1 : FAM83HはCK-1aのケラチン骨格への局在に関与する

FAM83H overexpression + CK-1 α knockdown



→ inhibition of keratin filament disassembly induced by FAM83H overexpression

図 2 2 : FAM83Hの細胞骨格形成制御にはCK-1 α が必要である

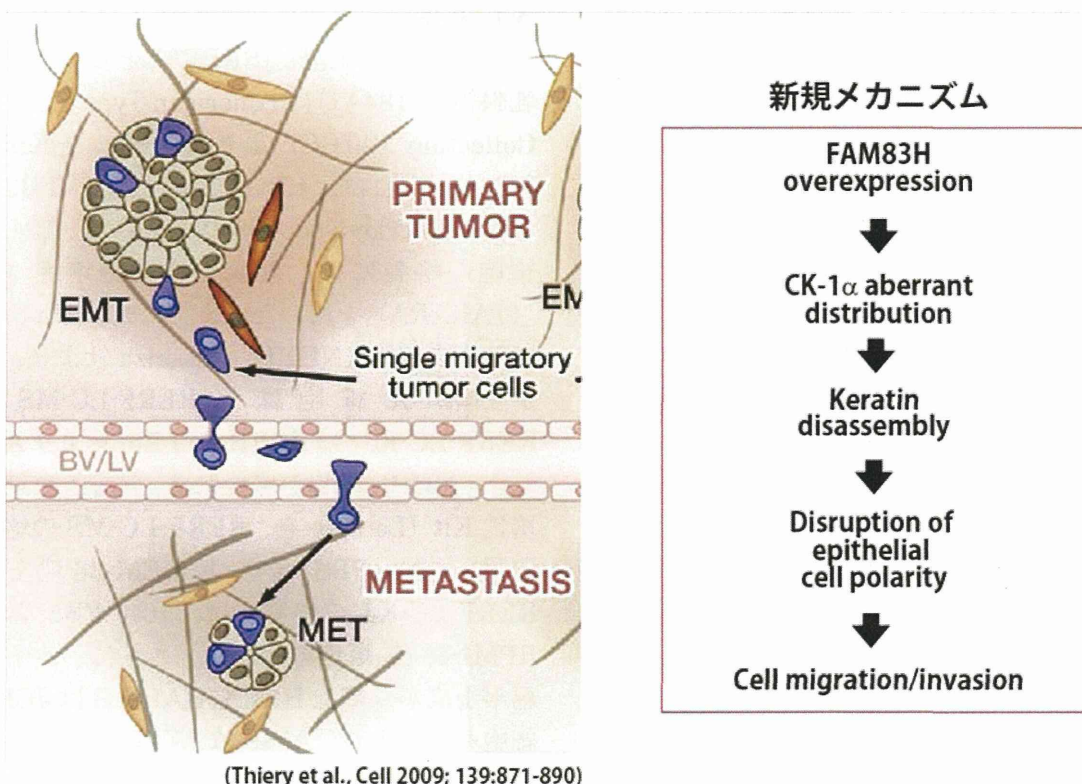


図 2 3 : FAM83Hの大腸癌浸潤のメカニズム

疾患関連蛋白質の解析基盤の研究

研究分担者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

研究要旨

本研究課題では、創薬バイオマーカー蛋白質の効率的探索・絞り込みを行いうる技術基盤の開発を目的に、①抗体プロテオミクス技術、②In vivo protein biotinylation 法、③Exosome に着目した解析法、を確立した。さらに、それら手法を駆使することによって、創薬バイオマーカー蛋白質の同定を試みた結果、乳がん特異的な創薬ターゲット蛋白質や肺がんの転移促進に関わる蛋白質、リンパ腫血管に特異的に発現する蛋白質、肺がん細胞から分泌される Exosome に特異性の高い蛋白質を見いだすことができた。これらの基盤技術は、創薬バイオマーカー探索研究、プロテオーム創薬の推進に貢献するものと期待される。

A. 研究目的

近年のプロテオミクス研究の進展に伴って、がんや自己免疫疾患をはじめとする各種難治性疾患に関連する創薬バイオマーカー蛋白質を探索・同定しようとする研究が、世界的規模で推進されている。この創薬バイオマーカー蛋白質には、疾患の発症や悪化といった病態を的確に診断するための「疾患マーカー蛋白質」や、疾患の発症や悪化に直接関与している「創薬ターゲット蛋白質」などが含まれており、これらの情報を有効活用することで、画期的診断薬・治療薬の開発が可能になるものと期待されている。しかし、創薬プロテオミクス研究から画期的診断薬・治療薬の開発に成功した例は、まだまだ乏しく、創薬バイオマーカー蛋白質を効率よく探索するとともに、有望な候補分子を絞り込む方法論の開発が期待される。

本観点から我々は、新しい創薬バイオマーカー蛋白質の探索・絞り込み法として、①候補蛋白質の有用性を迅速にバリデーション可能な抗体プロテオミクス技術、②in vivo における発現状態をそのまま反映し、腫瘍血管特異的な細胞膜蛋白質を同定可能な in vivo protein biotinylation 法、③細胞分泌ナノベシクルである exosome に着目した解析法の

確立を試みた。また、これら基盤技術の有用性を検証すべく、様々な創薬バイオマーカー候補蛋白質を同定し、その有用性を検証した。

B. 研究方法

B-1. 細胞

ヒト乳がん細胞株 (SKBR3) とヒト不死化乳腺細胞 (184A1) は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。SKBR3 細胞の培養には、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含む McCoy's 5a 培地 (Sigma) を、184A1 細胞の培養には、乳腺上皮細胞培地 Kit (TAKARA) を用いた。また、ヒト初代培養気管上皮細胞 (NHBE) は Lonza 社より、ヒト肺がん細胞株 (RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ) は JCRB Cell Bank より入手した。NHBE 細胞の培養には、気管上皮細胞培地 Kit (Lonza) を、RERF-LC-MS の培養には、10% FBS 含有 E-MEM 培地を、RERF-LC-KJ の培養には、10% FBS 含有 RPMI-1640 培地を用いた。さらに、ヒト肺扁平上皮がん細胞 HARA、HARA-B は JCRB 細胞バンクより、A549 は ATCC より、ヒト肺胞上皮細胞 HPAEpiC は ScienCell より入手した。HARA、HARA-B は 10% FBS 含有 RPMI-1640 を用いて、A549 は 10% FBS 含

有 EMEM を用いた。HPAEpiC は肺胞上皮用培地(ScienCell)を用いて培養した。いずれの細胞も継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。

B-2. 二次元ディファレンシャル電気泳動 (2D-DIGE)

SKBR3 と 184A1、及び RERF-LC-MS、RERF-LC-KJ と NHBE を細胞溶解液で可溶化し、2D Quant Kit (GE Healthcare) で蛋白質濃度を測定した。各細胞由来蛋白質を、それぞれラベル化試薬 cy2、cy3、cy5 (GE Healthcare) と反応させ、10 mM Lysine を加えて反応を停止させた。標識サンプルを混合し、IEF-PAGE・SDS-PAGEにより、2次元に蛋白質を分離した。ピック用ゲルは Deep Purple Total Protein Stain (GE Healthcare) を用いて染色した。発現変動解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE (GE Healthcare) を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (GE Healthcare) を使用した。抗体作製用の蛋白質抽出には、溶解可能ピックゲルを 88 mM NaIO₄ を用いて、ゲルを溶解することで得た。

B-3. MS 解析

ピックしたゲル片に 25 mM ammonium bicarbonate/ 50% acetonitrile を加えて脱色した。続いて acetonitrile を加えて、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器によって乾燥させた。脱水したゲル片に trypsin 溶液を加え、ゲル内の蛋白質を消化した。その後、ゲル片に acetonitrile を加え、消化ペプチドを回収した。これらを遠心濃縮器によって濃縮し、ZipTip C18 チップ (Millipore) で精製した。サンプル溶液 1 µl を Prespotted AnchorChip for Proteomics (BRUKER DALTONICS) に滴下し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS/MS、autoflexII、BRUKER DALTONICS) により解析した。

B-4. ナイープファージ抗体ライブラリの作製

ナイープファージ抗体ライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを導入した大腸菌 TG1 株を OD₆₀₀ = 0.3~0.6 まで培養した。M13KO7 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、感染細胞を 6 時間培養した。遠心後、回収した上清に 20% PEG-6000 を加えて、沈殿させ、得られた精製ペレットを NTE buffer に懸濁し、scFv 提示ファージとして回収した。

B-5. Dot Blot パンニング

Bio-Dot Microfiltration Apparatus に、ニトロセルロース膜を固定した。抽出した蛋白質をメンブレン上に固相化し、10% skim milk & 25% glycerol 溶液でブロッキングした。作製したナイープファージ抗体ライブラリを input とて反応させた。洗浄後、100 mM triethylamine で output ファージ溶液を回収し、それらに Tris-HCl (pH 8.0) を加えて中和した。

B-6. Dot Blot ELISA によるスクリーニング

パンニング後に回収したファージを TG1 に感染させてモノクローン化し、各々 OD₆₀₀ = 0.3~0.6 に達するまで培養した。ヘルパーファージを添加し、感染細胞を一晩培養した上清を以下のスクリーニング実験に用いた。一方で 2D-DIGE 解析から得られた抽出蛋白質を Bio-Dot Microfiltration Apparatus を用いてニトロセルロース膜上に固相化した。各 well をブロッキング処理し、上記のファージ上清、HRP/anti-M13 monoclonal Ab を順次反応させた。洗浄後、ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) で処理し、LAS-3000 を使用して検出・撮影した。

B-7. 組織アレイ解析(パラフィン組織)

ヒト正常肺・肺癌組織アレイ、ヒト正常乳腺・乳がん組織アレイ (US Biomax) をキ

シレン・エタノールにて脱パラフィン・親水処理を行い、DAKO Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO) に浸して、抗原を賦活化した。内在性のペルオキシダーゼ処理のため、DAKO Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO) で処理し、10% BSA でブロッキングを行った。各1次抗体【 10^{13} CFU/ml の scFv 提示ファージや抗ヒト CNTN-1 ポリクロナル抗体(R&D)、抗ヒト EphA2 ポリクロナル抗体(R&D)、抗ヒト EphA10 ポリクロナル抗体(Abgent)】、ENVISION+ Dual Link (DAKO) を順次反応させた。洗浄後、DAB+ liquid (DAKO) を用いて発色させた。組織マイクロアレイによる抗原発現のスコア化は、発現分布 [0 (0%), 1 (1-50%), 2 (51-100%)] と発現強度 [0 (no signal), 1 (weak), 2 (moderate) or 3 (marked)] を指標にスコアリングし、その合計が2以下で陰性または Low expression group、3以上で陽性または High expression group として、有意差検定を行った。

B-8. In vitro invasion assay

本試験には 96 well BME cell invasion assay Kit (Trevigen) を使用した。Top chamber に basement membrane extract をコートしたうえで、無血清培地で 1×10^6 cells/ml に調製した各細胞を播種した。bottom chamber には血清入り培地を加え、培養した。48 時間後、calcein-AM solution を添加することで bottom chamber に浸潤した細胞を蛍光標識した。細胞溶解後の蛍光強度を、ARVO MX を用いて測定した。培地だけの蛍光強度を 0%、Top chamber に播種した細胞の蛍光強度を 100% として、bottom chamber に浸潤した細胞の割合を算出した。

B-9. B 細胞移植マウスモデルの作製

ATCC より購入したマウス B 細胞リンパ腫 A20 細胞を BALB/c マウスに対して、尾静脈より播種し、26 日後のマウスを B 細胞リンパ腫転移モデルとして使用した。

B-10. In vivo biotinylation 法

胸腔を切開したマウスの心臓の左心室より、NHS-LC-Biotin(Pierce)を環流させた。その後、10% Dextran 50 mM Tris-HCl (pH7.4) を環流させることで反応を停止させた。肝臓・脾臓・腸間膜リンパ節をそれぞれ回収し、Lysis buffer (2% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 10 mM EDTA, complete (Roche)) 中でホモジネート後、ソニケーションにて蛋白質を溶解させた。ヨードアセトアミドにて還元アルキル化した組織ホモジネートを、SA Sepharose (GE Healthcare) に添加することで、ビオチン化タンパク質をレジンに結合させた。洗浄後、トリプシンを添加して消化した。OMIX にて脱塩し、質量分析により蛋白質を同定した。

B-11. 免疫組織化学染色(凍結組織)

凍結組織をクリオスタットにて切り出し、同定された蛋白質に対する抗体で免疫染色を行った。なお、本検討で用いた抗体を以下に示す。rat anti-mouse CD166, rat anti-mouse CD98, rat anti-mouse BST-2 (129c), rat anti-mouse BST-2 (927) (以上 eBioscience); rat anti-mouse endoglin, goat anti-mouse EMILIN-1, rabbit anti-mouse PECAM-1(以上 Santa Cruz Biotechnology); rat anti-mouse transferrin receptor (Abcam); rat anti-mouse CD205 (AbD Serotec); goat anti-mouse clusterin (R&D Systems); rat anti-mouse PECAM-1 (BD Biosciences); mouse anti-human BST-2(Abnova)

B-12. 抗 BST-2 抗体による腫瘍増殖抑制効果

A20 細胞を移植した5日後のマウスに対して、抗 BST-2 抗体を 5 mg/kg で1週毎に計3回尾静脈投与し、アイソタイプ抗体投与群と腫瘍体積を比較検討した。

B-13. Exosome の調製と解析

各細胞の培養上清を回収し、高速遠心、フィルターろ過、超遠心を順次行った。得られたペレットを PBS で懸濁し、Exosome 分画として回収した。Exosome の粒子径は動的光散乱法で測定し、その形状は透過型電子顕微鏡 (HITACHI H-7650) により観察した。

B-14. Exosome のプロテオーム解析

蛋白質量として 1 μg の Exosome をトリプシン処理し、消化ペプチドを遠心濃縮器によって濃縮した後、ZipTip C18 チップを用いて精製した。蛋白質の同定には、LTQ Orbitrap XL(Thermo Scientific)を用いて、メチオニン残基の酸化、Iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮し、Mascot search により swiss prot のデータベースをもとに解析した。

B-15. Real Time PCR

C. 研究結果

C-1. 抗体プロテオミクス技術の開発と乳がん組織特異的バイオマーカー蛋白質の探索

我々はこれまでに、蛋白質の解析に必須のモノクローナル抗体を *in vitro* で作製可能なファージ抗体ライブラリに着目し、プロテオーム解析で見いだされる疾患関連創薬バイオマーカー蛋白質候補に対して迅速かつ網羅的に抗体を作製可能な方法論「抗体プロテオミクス技術」を開発してきた (Fig. 1)。これにより、数多くの発現変動蛋白質の中から発現分布などを指標に、有用な蛋白質の効率的な絞り込みが期待される。そこで本年度は、本基盤技術の有用性を検証すべく、乳がん細胞と正常乳腺細胞に適用した。新規乳がん関連マーカー蛋白質の探索を目的として、不死化乳腺細胞株 184A1 と乳がん細胞株 SKBR3 の 2D-DIGE 解析を試み、特に発現変動率の大きかった 21 個の spot を見いだした。ピックアップしたゲル片からそれぞれ蛋白質を抽出して MS 解析した結果、全ての蛋白質を同定した。

乳がん組織由来の cDNA は、OriGene technologies より購入した。PCR は、左記の cDNA を Template に、TaqMan Gene Expression Master Mix と TaqMan probe set から反応液を調製し、各遺伝子を増幅させた。Threshold cycle は、デフォルトの Analyze 機能を用いて決定した。EphA10 mRNA の発現レベルは、actin-beta を用いて補正した。統計解析にあたっては、中央値よりも発現レベルの高い症例を High expression group、低い症例を Low expression group として、有意差検定を行った。

B-16. 統計解析

分割表解析は、 χ^2 test または Fisher's exact test により有意差を検定した。また、2 群・3 群間の有意差は、各々 Mann-Whitney・Kruskal-Wallis test により検定した。

また、残りの抽出蛋白質をニトロセルロース膜へと blot し、Dot Blot を用いたパンニング法を同時に行った。その結果、パンニングを繰り返す度に目的とする抗体が濃縮され、全ての候補に対するモノクローナル抗体を約 2 週間という短期間に単離することに成功した。そこで、これら抗体提示ファージを用いて、多数の乳がん組織・正常乳腺組織が搭載された組織アレイを免疫染色したところ、正常乳腺組織では発現が認められず、乳がん組織にのみ発現が認められた乳がん特異的な蛋白質を多数同定することに成功した (Table 1)。この中には、TRAIL-R2 のように、既に乳がんなどでの関与が指摘されている既知の蛋白質の他にも、RREB1 や Eph receptor A10 (EphA10) のように、乳がんとの関連が知られていない興味深い蛋白質も含まれていた。本結果は、候補蛋白質を網羅的にバリデーションした故に得られた知見であり、本技術の有用性を示唆するものである。

C-2. 抗体プロテオミクス技術による転移関

連バイオマーカー蛋白質の探索と評価

前年度までに抗体プロテオミクス技術を開発し、乳がん特異的蛋白質の探索を通じて、その有用性を示してきた。そこで本年度は、抗体プロテオミクス技術の汎用性を検証すべく、がんの重要な予後決定因子である転移に関連する蛋白質の同定を試みた。高転移性肺がん細胞株 RERF-LC-KJ と低転移性の肺がん細胞株である RERF-LC-KJ、さらに正常気管上皮細胞に対して、まず、2D-DIGE 解析によって肺がん細胞特異的かつ転移に関連する蛋白質候補を探索した。その結果、16 種類の候補蛋白質を同定する一方で、これら全てに対し、モノクローナル抗体の創製に成功した。そこで転移に関する臨床情報のある肺がん組織及び正常肺組織が搭載された組織アレイを免疫染色した結果、正常組織に比較して肺がん組織で高率に発現し、リンパ節転移陰性症例に比べて陽性症例で発現の高い Oxysterol binding protein like 5(OSBPL5) と Calumenin(CALU)を見いだした(Table 2)。これら蛋白質の機能を解析するため、強制発現・ノックダウン細胞を用いて *in vitro* invasion assay を試みた。その結果、両蛋白質共に、強制発現細胞で浸潤性が亢進し、ノックダウンにより浸潤性が抑制され、両蛋白質が浸潤促進を一因として、転移陽性症例で有意に発現していた可能性が考えられる。以上より、抗体プロテオミクス技術は、汎用性の高い基盤技術である可能性が示された。

C-3. *In vivo* biotinylation 法による腫瘍血管特異的蛋白質の同定と分子標的治療薬の開発

抗 VEGF 抗体による抗腫瘍血管療法の開発により、様々ながんにおいて既存の治療薬との効果の上乗せが期待されている。しかし、VEGF は正常の血管新生にも重要な役割を担っており、副作用発現の観点から腫瘍血管特異性の高い新たな創薬ターゲット蛋白質の同定が待望されている。その点、*in vivo* biotinylation 法は、①*in vivo* におけるタンパ

ク質の発現状態をそのまま反映していること、②腫瘍血管に発現するために、がん組織への浸透性を考慮せずに利用できること、③正常血管と比較するため、腫瘍血管特異抗原が同定される可能性が高いこと、④抗体医薬の分子標的として有用性が高い膜蛋白質を効率良く精製できることなど、数多くの利点が挙げられる。そこで、本年度は、本技術を用いて、腫瘍血管特異的な創薬ターゲット蛋白質を同定し、新規分子標的治療薬開発の可能性を検証した。A20 リンパ腫移植マウスに対してビオチン化試薬を環流して、血管に発現する蛋白質をラベル化した。転移巣のがん血管がラベル化されていることを確認したうえで、この組織からビオチン化タンパク質を回収し、質量分析により蛋白質同定を行うと共に、DeepQuantER にて定量解析を行った。その結果、発現量が上昇していた蛋白質の中で、同定された上位の蛋白質 8 種類を選択した。各候補蛋白質に対する抗体を用いて、移植したがん組織に対して免疫染色を行ったところ、これまでに報告のある腫瘍関連抗原である Transferrin Receptor や Endoglin などの発現は低かったのに対して、BST-2 や EMILIN-1 などは、血管に対して特異的かつ高い発現量を示すことが明らかとなった。そこで、BST-2 に対してさらなる検討を進めたところ、BST-2 は正常の組織(脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、リンパ節、腎臓、小腸、腎臓さらに筋肉)では発現が認められなかった(Fig. 2)。そこで、BST-2 抗体を用いた抗体療法の可能性を検証した。Ramos、DoHH-2、SU-DHL-4 細胞をマウスに移植し、BST-2 の発現を確認したうえで、抗 BST-2 抗体を投与し、腫瘍血管集積性及び腫瘍増殖抑制効果を評価した。その結果、抗 BST-2 抗体は腫瘍血管に集積し、皮下移植した腫瘍の増殖抑制効果が観察された。最後に、ヒトのリンパ腫組織(非ホジキンリンパ腫、播種性大 B 細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、慢性リンパ腫など)における BST-2 の発現を免疫染色により

検証した結果、いずれの組織においても BST-2 が発現していることが明らかとなった。今回同定された BST-2 は TypeII の膜糖蛋白質であり、ミエローマ細胞に高発現することが知られていた。本研究では、ミエローマのみならず、その血管にも発現していることを明らかにし、BST-2 に対する抗体が腫瘍増殖抑制効果を持っていたことから、リンパ腫に対する新しい創薬ターゲットとして、抗体医薬品の創製に期待が寄せられる。

C-4. がん細胞分泌 Exosome に着目した新規肺がんバイオマーカー蛋白質の探索

Exosome は、細胞・組織から分泌される直径 100 nm ほどの小胞であり、近年、ドナー細胞由来の蛋白質や miRNA を内包・安定化して、遠隔のレシピエント細胞に情報を伝達する新たな因子として注目されている。健常者に比較してがん患者で血中 Exosome 量が増大することも報告されており、がんにおける Exosome の役割解明、並びにがん関連マーカーとしての利用が期待されている。そこで本年度は、正常細胞から分泌される Exosome 由来の蛋白質に比較して、がん細胞から分泌される Exosome でユニークに発現している蛋白質を同定し、創薬バイオマーカー蛋白質としての有用性評価を試みた。初代ヒト正常肺胞上皮細胞(HPAEpiC)とヒト肺がん細胞株(HARA、HARA-B、A549)の培養上清から調製した Exosome を精製し、質量分析により各 Exosome のプロテオームを比較解析した。その結果、HPAEpiC 由来 Exosome に比べ、がん細胞(HARA、HARA-B、A549)由来 Exosome で共通して高発現していた 109 種類の蛋白質を同定した。これらの中には、膜蛋白質であって、これまで Exosome 上での発現が報告されていない新規の創薬バイオマーカーとなりうる候補(Eph receptor A2(EphA2)、Contactin-1 (CNTN1))もあった。そこで、これらの肺がんバイオマーカー蛋白質としての有用性を検証するため、組織アレイにて発現プロファイ

ルを解析したところ、両蛋白質とも正常肺組織では染色されなかったのに対し、肺がん組織で発現していることが明らかとなった(EphA2 : 68%、CNTN1 : 21%)。また、病理学的組織型による発現差異を解析した結果、EphA2 は多くの組織型の肺がんが発現していたのに対し、CNTN-1 は非小細胞肺癌の中で、肺腺扁平上皮がんにおいて、約 90% (10 症例中 9 症例が陽性)の患者が発現していることが判明した(Fig. 3)。肺腺扁平上皮がんの症例数は少ないものの、予後不良であることが報告されている。従って、CNTN-1 は肺がんの中でも難治性の肺腺扁平上皮がんの可能性を示すバイオマーカー蛋白質として有用であることが示唆された。

C-5. 新規乳がん関連バイオマーカー蛋白質 EphA10 の創薬ターゲットとしての有用性評価

抗体プロテオミクス技術から見いだされた乳がん特異的蛋白質の 1 つである EphA10 は、チロシンキナーゼ型の Eph receptor ファミリーの 1 つである。近年、EphA2 や EphB4 などのファミリー分子が、がんの発症・増殖・転移などの悪性形質に関与することが報告され、EphA2 に対するモノクローナル抗体が臨床試験中であるなど、Cancer biology や創薬の観点から Eph receptor ファミリーが注目されている。しかしながら、EphA10 に関しては、精巢に mRNA レベルで発現していることが報告されている以外、ほとんど何も明らかにされていない機能未知蛋白質である。そこで本年度は、EphA10 が乳がんの新たな分子標的治療薬のターゲットになりうるか、発現分布の観点から有用性を評価した。まず、様々な臨床情報を有した症例のがん組織を免疫染色し、EphA10 の発現分布と各パラメータとの相関を解析した。その結果、EphA10 は、リンパ節転移陽性症例、並びにステージの進行に伴って有意にその発現割合が高くなることを mRNA・蛋白質レベルで明らかにした(Fig. 4)。したがって、詳細な機能解析は必

要なもの、EphA10は乳がんの悪性化に関わる重要な蛋白質の1つであることが示唆された。また、既存の分子標的治療薬のターゲットとの発現の相関を解析したところ、Her2陰性症例や、難治性のTNBC症例にも発現が認められた一方で、正常組織では精巣以外で発現が認められなかったことから、有効な治療法のない症例に対する新たな治療薬標的になりうるということが示唆された。

D. 考察

C. 研究結果に記載

E. 結論

創薬を指向した疾患プロテオミクス研究を推進するため、この5年間で、①抗体プロテオミクス技術、②In vivo biotinylation法、③Exosomeに着目した解析法を確立し、以下の知見を得た。

- 抗体プロテオミクス技術を活用し、これまでに乳がんとの関連が知られていない新規の乳がん特異的蛋白質を多数同定した。
- 上記で同定されたEphA10は、(1)乳がんのリンパ節転移やステージの進行に伴って高率に発現し、乳がんの悪性形質に関与する可能性があること、(2)Her2陰性症例や、TNBC症例にも発現している一方、正常組織では精巣にのみ発現が認められるため、これら有効な治療法のない症例の有用な創薬ターゲットになりうることを示した。
- 抗体プロテオミクス技術を活用し、肺がん特異的かつリンパ節転移に相関するOSBPL5、CALUを世界に先駆けて同定した。またこれら蛋白質はがん細胞の浸潤性の促進に関わることを分子レベルで明らかにした。
- In vivo biotinylation法を駆使することによって、リンパ腫血管に高発現するBST-2を同定し、これに対するモノクローナル抗体が抗腫瘍効果を示した。したがって、BST-2は、リンパ腫に対する新しい創薬

ターゲットとして、抗体医薬品の創製にも期待が寄せられる。

- 近年、新たな細胞-細胞情報伝達因子として、その役割が注目されているExosomeに着目したプロテオーム解析により、新規肺がんマーカー候補として、EphA2とCNTN1を同定した。

以上の成果は、疾患プロテオミクス研究を推進するための有用な基盤技術になりうることを示しており、プロテオーム創薬に貢献することが期待される。

F. 研究発表

F-1. 論文発表

【原著論文】

- Schliemann, C., Roesli, C., Kamada, H., Borgia, B., Fugmann, T., Klapper, W. & Neri, D. In vivo biotinylation of the vasculature in B cell lymphoma identifies BST-2 as a target for antibody-based therapy. *Blood* **115**(3), 736-44 (2010).
- Imai, S., Nagano, K., Yoshida, Y., Okamura, T., Yamashita, T., Abe, Y., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Kamada, H., Mukai, Y., Nakagawa, S., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Development of an antibody proteomics system using a phage antibody library for efficient screening of tumor-related biomarker proteins., *Biomaterials* **32**(1), 162-9 (2011).
- Yamashita, T., Okamura, T., Nagano, K., Imai, S., Abe, Y., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Tsunoda, S. Rho GDP-dissociation inhibitor alpha is associated with cancer metastasis in colon and prostate cancer. *Pharmazie* **67**(3), 253-5 (2012).
- Yamashita, T., Nagano, K., Kanasaki, S., Maeda, Y., Furuya, T., Inoue, M., Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Yoshioka, Y.,

Itoh, N., Abe, Y., Kamada, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S. Annexin A4 is a possible biomarker for cisplatin susceptibility of malignant mesothelioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**,140-4 (2012).

5. Nagano K. Search for breast cancer-related biomarker proteins for drug discovery. *Yakugaku Zasshi*, **130**(12), 1701-1706 (2010).
6. 鎌田春彦: 抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術, *薬学雑誌*, **132**(4), 473-7 (2012).

【総説ほか】

1. Nagano K. Search for breast cancer-related biomarker proteins for drug discovery., *Yakugaku Zasshi*, **130**(12), 1701-06 (2010).
2. 鎌田春彦: 抗体工学を駆使した創薬ターゲットの探索技術, *薬学雑誌*, **132**(4), 473-7, (2012).

F-2. 学会発表

【国際学会発表】

1. Imai S., Tsunoda S. Yoshida Y, Nakagawa S., Fukuoka J., Tsutsumi Y.: A novel system for efficiently screening tumor-related proteins using antibody proteomics., HUPPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, Amsterdam (The Netherlands), 16 - 20 August, 2008.
2. Nagano K., Okamura T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Antibody proteomics technology for efficient screening of tumor-related proteins using phage antibody library., Biomarker World Congress 2009, Philadelphia (U.S.A.), 27-29 May, 2009.
3. Nagano K., Okamura T., Yamashita T., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Search for tumor-related biomarker

proteins by antibody proteomics technology., HUPPO 8th Annual World Congress, Toronto 2009, Toronto (Canada), 26-30 September, 2009.

4. Nagano K., Yamashita T., Imai S., Abe Y., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Identification and evaluation of novel breast cancer related biomarker proteins by antibody proteomics technology., 21st Meeting of the European Association for Cancer Research., Oslo (Norway), 26-29 June, 2010.
5. Nagano K., Yamashita T., Watanabe T., Kanasaki S., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Identification of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology., HUPPO2010 World Congress, Sydney (Australia), 19-23 September, 2010.
6. Kanasaki S., Nagano K., Yamashita T., Watanabe T., Maeda Y., Zhao X., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Itoh N., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Expression and functional analysis of ephrin receptor A10 in triple negative breast cancer., 2010 FAPA CONGRESS, Taipei (Taiwan), 5-8 November, 2010.
7. Kamada H., Abe Y., Nagano K., Tsutsumi Y., Tsunoda S.: The search for a biomarker of hepatic injury expressed by sinusoidal endothelial cells., HUPPO2011(10th World Congress), Geneva(Switzerland), 4-7 September, 2011.
8. Nagano K., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Imai S., Abe Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : The relationship between oxysterol binding protein like 5 and calumenin during lymph node metastasis., The 2011 European Multidisciplinary Cancer

Congress (2011 Stockholm Cancer Congress), Stockholm (Sweden), 23-27 September, 2011.

9. Kamada H., Yamashita T., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Nagano K., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Detection of drug-target proteins on tumor-derived exosomes by ELISA using anti-CD81 antibodies, EACR-22, Barcelona (Spain), 7-10 July, 2012.
10. Nagano K., Yamashita T., Kamada H., Kanasaki S., Maeda Y., Inoue M., Katayama S., Yoshioka Y., Abe Y., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Proteome analysis of lung cancer cell-derived exosomes for discovery of diagnostic biomarkers, HUPO 11th Annual World Congress (HUPO 2012), Boston (USA), 9-13 September, 2012.

【国内学会発表】

1. 吉田康伸, 今井 直, 長野一也, 岡村賢孝, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによるがんリンパ節転移マーカーの探索., 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 (兵庫), 2008 年 12 月.
2. 長野一也, 今井 直, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 疾患プロテオミクスからバイオマーカーの創出へー抗体プロテオミクス技術の確立とがん関連マーカーの探索ー., 日本薬学会 第 129 年回, 京都(京都), 2009 年 3 月. (大学院生シンポジウム)
3. 長野一也, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクス技術による肺がん関連バイオマーカー蛋白質の探索., 平成 21 年度がん特定若手研究者ワークショップ, 茅野 (長野), 2009 年 9 月.
4. 金崎聡一郎, 長野一也, 山下琢矢, 岡村賢孝, 渡邊貴信, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : Ephrin receptor A10 の新規乳がん創薬標的としての有用性評価., 第 26 回日本

DDS 学会学術集会, 大阪(大阪), 2010 年 6 月.

5. 長野一也, 山下琢矢, 岡村賢孝, 小泉桂一, 済木育夫, 堤 康央, 角田慎一 : 新規乳がん関連蛋白質 EphA10 および RREB-1 の転移との関連解析., 第 19 回日本がん転移学会, 金沢(石川), 2010 年 6 月.
6. 長野一也 : 抗体プロテオミクス技術による創薬バイオマーカーたんぱく質の効率的探索., 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪(大阪), 2010 年 10 月.
7. 金崎聡一郎, 長野一也, 山下琢矢, 前田祐香, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一 : 腫瘍血管新生に及ぼす Exosome の生理機能の解明., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月.
8. Yamashita T., Nagano K., Kanasaki S., Maeda Y., Furuya T., Inoue M., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S. : Membrane proteome analysis of exosomes for lung cancer diagnosis., 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム., 名古屋(愛知), 2011 年 11 月.
9. 鎌田春彦, 山下琢矢, 長野一也, 前田祐香, 阿部康弘, 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央, 角田慎一 : がん細胞分泌エクソソームのプロテオーム解析によるバイオマーカー候補蛋白質の探索., 日本プロテオーム機構 第 10 回大会, 東京(東京), 2012 年 7 月.
10. Nagano K., Yamashita T., Maeda Y., Yoshioka Y., Abe Y., Kamada H., Tsutsumi Y., Tsunoda S. : Identification of lymph node metastasis-related proteins in lung cancer by antibody proteomics technology., 第 71 回日本癌学会学術集会., 札幌(北海道), 2012 年 9 月.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
 - 1) 角田慎一, 堤 康央, 新規腫瘍マーカーを用いた乳癌の検査方法、特願 2009-060706.
 - 2) 角田慎一, 長野一也, 堤 康央, 抗体、乳が

んの治療に用いられる医薬組成物、腫瘍検査方法、及び、腫瘍検査用試薬、特願2011-57029・PCT/JP2012/001802.

3) 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央、肺腺扁平上皮癌の腫瘍マーカー及び診断キット、特願2012-050629.

7. 実用新案登録

なし。

8. その他

なし。

H. 研究協力者

堤 康央	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
鎌田春彦	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
長野一也	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
山下琢矢	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
井上雅己	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト
國丸亜記	医薬基盤研究所	バイオ創薬プロジェクト

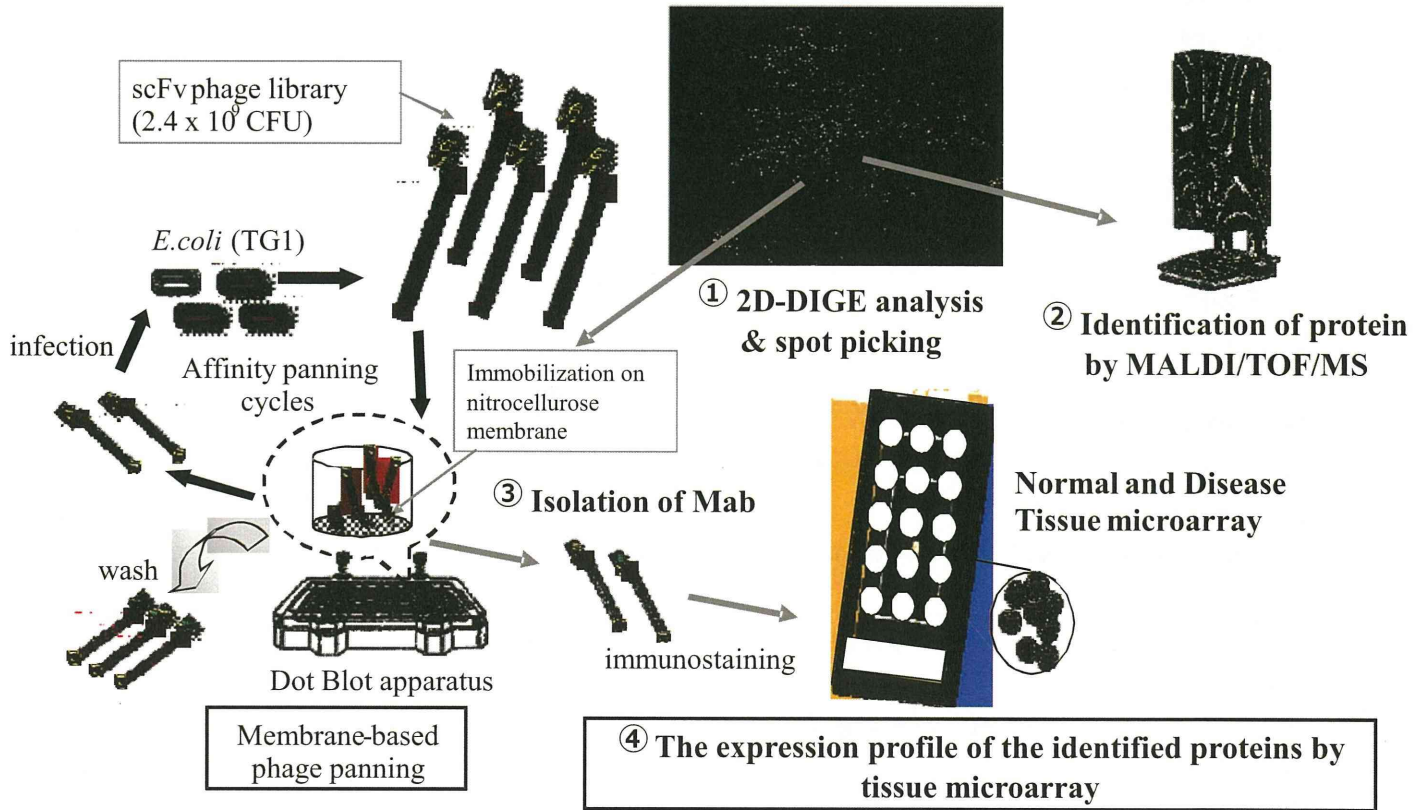


Fig. 1 Schematic illustration of screening drug-discovery biomarker proteins using antibody proteomics technology

Table 1. Positive rate of identified proteins in breast cancer and normal breast tissues

protein name	positive rate of antigens			
	normal breast tissues		breast cancer tissues	
Her-2	0 / 15	(0 %)	53 / 189	(28 %)
IkappaBR	3 / 15	(20 %)	22 / 189	(12 %)
SPATA5	0 / 15	(0 %)	0 / 189	(0 %)
beta actin variant	0 / 15	(0 %)	0 / 189	(0 %)
TRAIL-R2	0 / 15	(0 %)	119 / 189	(63 %)
RREB1	1 / 15	(7 %)	83 / 189	(44 %)
FLJ31438	0 / 15	(0 %)	0 / 189	(0 %)
PAK65	0 / 15	(0 %)	0 / 189	(0 %)
Cytokeratin 8	0 / 15	(0 %)	137 / 189	(73 %)
XRN1	0 / 15	(0 %)	0 / 189	(0 %)
Jerky protein homolog-like	0 / 15	(0 %)	0 / 189	(0 %)
Eph receptor A10	0 / 15	(0 %)	93 / 189	(49 %)

Table 2 Co-relationship analysis between expression profile and lymph node metastasis

Protein name	Ratio of candidate protein positive cases			
	in lymph node metastasis negative cases (20 cases)		in lymph node metastasis positive cases (26 cases)	
Actinin alpha I	4 / 20	(20%)	4 / 26	(15%)
OSBPL5	4 / 20	(20%)	15 / 26	(58%)
Downstream of tyrosine kinase 7	17 / 20	(85%)	13 / 26	(50%)
Aldehyde dehydrogenase	5 / 20	(25%)	7 / 26	(27%)
Cytokeratin 7	14 / 20	(70%)	10 / 26	(38%)
Cytokeratin 8	19 / 20	(95%)	21 / 26	(81%)
CALU	3 / 20	(15%)	15 / 26	(58%)
Cytokeratin 18	15 / 20	(75%)	13 / 26	(50%)
Acyl CoA Dehydrogenase	8 / 20	(40%)	6 / 26	(23%)
Pulmonary surfactant apoprotein	13 / 20	(65%)	5 / 26	(19%)
Glutation S transferase	10 / 20	(50%)	11 / 26	(42%)

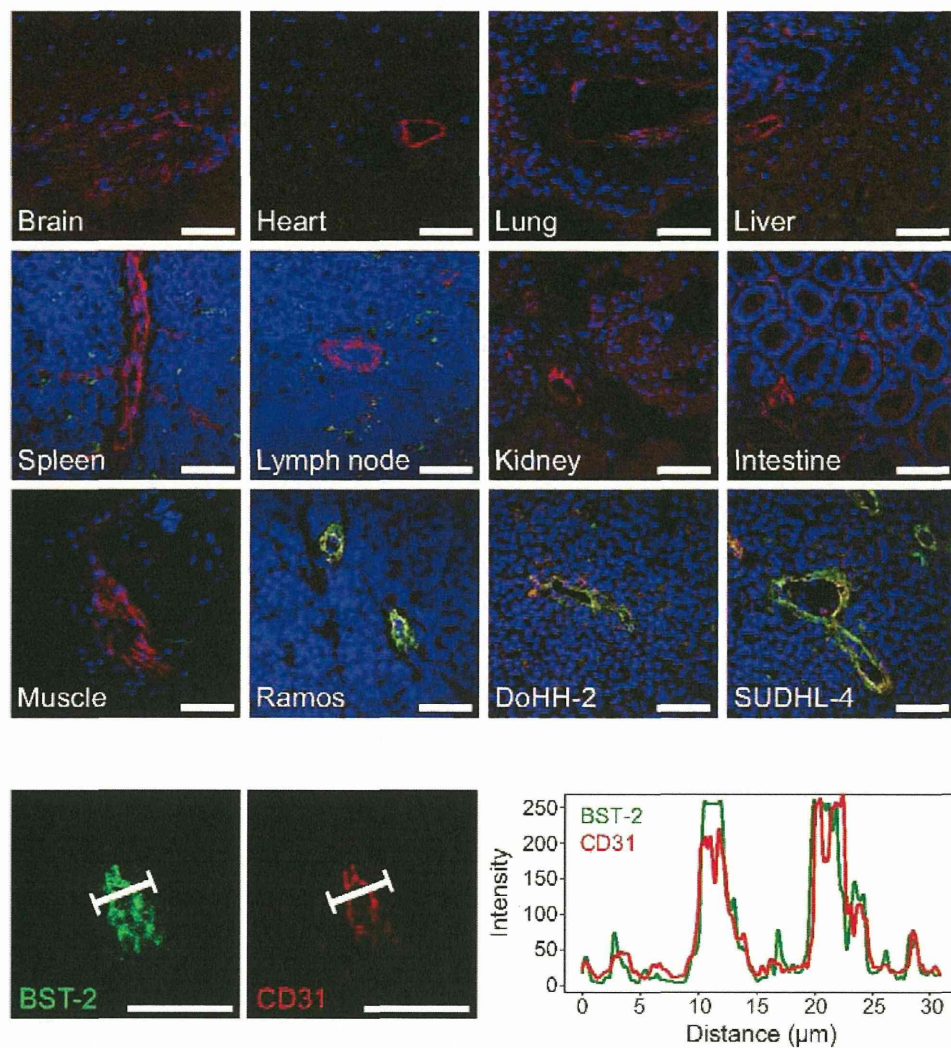


Figure 2. Expression of BST-2 in normal mouse organs and lymphoma xenografts.

(A) Three-color confocal images of BST-2 staining (clone 129c, green), CD31 staining (red), and 4,6-diamidino-2-phenylindole counterstaining (blue) are shown. Although being undetectable in the vasculature of brain, heart, lung, liver, spleen, lymph nodes, kidney, intestine, and skeletal muscle, BST-2 was readily detectable in different lymphoma xenografts (Ramos, DoHH-2, SUDHL-4) in the same experiment, colocalizing to CD31 (yellow). As expected, a scattered cellular, but not vascular, expression of BST-2 was observed in lymphoid tissues. (B) Graphs displaying the spatial distribution of BST-2 and CD31 fluorescent signals in confocal microscopy were virtually superimposable. Scale bars represent 50 μm. Slides were viewed with an LSM510 Meta confocal microscope (Carl Zeiss). Images were acquired with the LSM510 Meta confocal laser scanning microscope and software provided by the manufacturer (Carl Zeiss). Images were manipulated using ImageJ software, Version 1.42q.

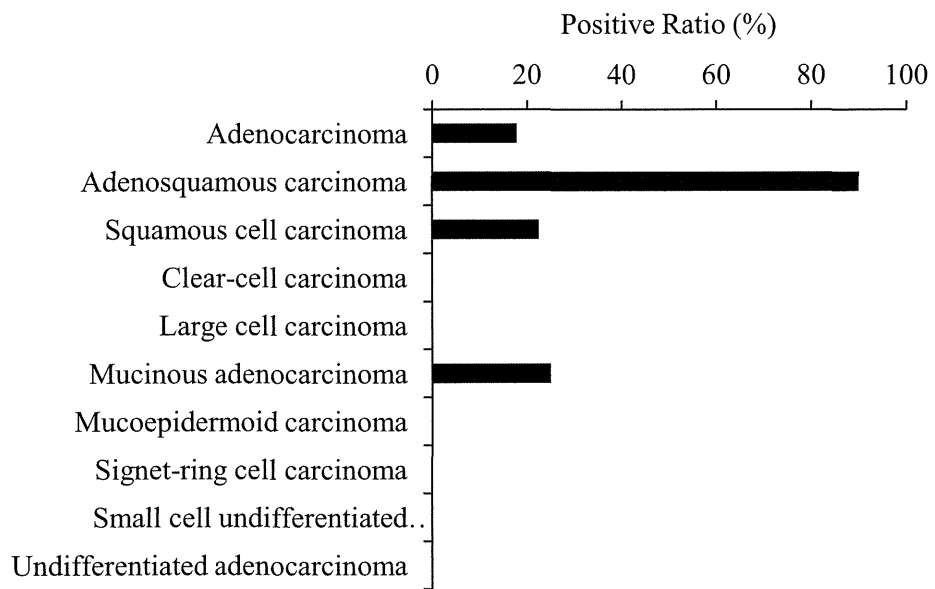


Fig. 3 CNTN-1 expression in various type of human lung tumor tissue.
Expression of CNTN-1 was analyzed using tissue microarray.